Estudio morfológico y cinético de comunidades microbianas que degradan celulosa en suelos con diferentes manejos agrícolas bajo siembra directa

Gomez, E. L.[1], A. E. Romero[1], M. C. Iglesias[1] y L. G. Wall[2]
[1]Cát. de Microbiología Agrícola- Fac. de Cs. Agrarias-UNNE Sargento Cabral Nº 2.131 Corrientes. [2]Dpto de Ciencia y Tecnología-UNQ Roque Sáenz Peña Nº 352 Bernal. iglesmc@hotmail.com

RESUMEN: La celulosa es el carbohidrato más abundante en los restos vegetales y es el principal producto que se incorpora a los suelos. Es degradada por la acción de poblaciones microbianas mixtas. Esta descomposición también depende de condiciones ambientales como la humedad, temperatura, aireación, nivel de nitrógeno, contenido de materia orgánica y de la relación C:N de los restos orgánicos. Entre los beneficios de la degradación de materiales celulósicos están el aumento en las fuentes de energía y de carbono, promoviendo la actividad microbiana y mejoras en la estabilidad de los agregados del suelo. El objetivo de este trabajo fue comenzar a caracterizar el consorcio microbiano asociado a la degradación de celulosa en suelos agrícolas con diferentes manejos bajo siembra directa. Se utilizaron muestras de suelo de Bengolea y Monte Buey (Prov. de Córdoba), Pergamino (Prov. de Buenos Aires) y de Viale (Prov. de Entre Ríos), donde se analizaron tres situaciones: Ambiente Natural, Buenas Prácticas Agrícolas (agricultura en siembra directa con rotaciones de cultivos) y Malas Prácticas Agrícolas (agricultura en siembra directa con monocultivo). Se evaluó la actividad celulolítica mediante una técnica descripta por Winogradsky en 1929 con modificaciones, utilizando microdiscos de papel de filtro como fuente de celulosa sobre placas de suelo. Las placas fueron incubadas a 30ºC y con humedad controlada periódicamente por gravimetría. A los 14, 28 y 35 días se evaluó el porcentaje de degradación de los microdiscos. Con esta metodología se pusieron en evidencia las comunidades microbianas asociadas a la degradación del papel, con la aparición de colores y diferentes texturas, complejidad microbiana que se manifiesta como comunidades de distintos morfotipos al microscopio electrónico. Se registraron cuali y cuantitativamente las distintas manifestaciones morfológicas y su aparición secuencial en el tiempo sobre los microdiscos de papel. Se encontraron diferencias significativas entre sitios y entre tratamientos en la velocidad de degradación del papel y en la diversidad microbiológica asociada. Estos resultados sientan las bases experimentales para encarar un análisis en mayor profundidad, utilizando técnicas moleculares a los consorcios microbiológicos involucrados en la actividad celulolítica presente en las muestras de suelo. Para ello en una próxima etapa aplicaremos técnicas moleculares independientes del cultivo para el análisis de los diferentes morfotipos observados.

PALABRAS CLAVE: Actividad Celulolítica - Diversidad - Manejo del Suelo - Siembra Directa

INTRODUCCION: La celulosa es el carbohidrato más abundante en los restos vegetales y es el principal producto que se incorpora a los suelos (Alexander 1980). Es degradada por la acción de poblaciones microbianas mixtas, donde un grupo importante son las bacterias, actinomicetes y los hongos. Estos microorganismos descomponen con mayor eficiencia, la celulosa en condiciones mesotérmicas y presentan algunas características muy particulares, sobre todo la abundante producción de un coloide poliurónico. Este coloide, que agregado al suelo en mínimas dosis provoca un aumento considerable de la estabilidad de los agregados, sería un producto prácticamente idéntico al humus coloidal. Por otra parte esta descomposición depende de la naturaleza de los microorganismos colonizadores y de condiciones ambientales como humedad, temperatura, aireación, nivel de nitrógeno, contenido de materia orgánica y de la relación C:N de los restos orgánicos (Piao *et al.,* 2006). Entre los beneficios que se obtienen de la descomposición de los materiales celulósicos podemos citar el aumento en las fuentes de energía y de carbono, que promueven la actividad microbiana y las mejoras en la estabilidad de los agregados del suelo (Kato *et al.*, 2004; Crovetto 2002). El objetivo fue caracterizar el consorcio microbiano asociado a la degradación de celulosa en suelos agrícolas con diferentes situaciones de manejo bajo siembra directa, teniendo en cuenta la funcionalidad y diversidad presente.

MATERIALES Y METODOS: Se definieron tres tratamientos de uso del suelo bajo siembra directa de acuerdo a la productividad sustentable según los registros de los agricultores: 1) Buenas Prácticas Agrícolas (BP), gestión con rotación intensiva de cultivos, reposición racional de nutrientes y manejo integral de plagas, lo cual genera altos rendimientos de cultivo; 2) Malas Prácticas Agrícolas (MP), gestión con tendencia al monocultivo sin reposición de nutrientes, con menores rendimientos de cultivo; 3) Ambiente Natural (AN) como referencia del sitio. Los bloques de los tratamientos se replicaron en cuatro sitios a través de una transecta oeste-este, ubicados en las cercanías de las localidades de Bengolea (BG), Monte Buey (MB), ambos en Córdoba,

Pergamino (PG) en Buenos Aires y Viale (VL) en Entre Ríos. Cada muestra consistió en un compuesto de 16-20 submuestras de suelo a una profundidad de 0-10 cm en un área de 5 m^2, tomadas por triplicado a intervalos de al menos 50 metros distribuidos en el lote evitando seguir la línea de siembra. Las muestras se tamizaron por malla de 2mm y se secaron a Tº ambiente y se conservaron en un lugar fresco y en oscuridad hasta su análisis. La actividad celulolítica se evaluó en el suelo, utilizando una técnica sistémica que implica poner en juego las comunidades microbianas del suelo y los componentes bioquímicos del mismo. Esta técnica es independiente del cultivo de los microorganismos y, analiza a la actividad *in situ* considerando el suelo como el mismo soporte en el que se mide la actividad (Winogradsky 1949). Se construyeron placas de suelo en cajas de Petri, una por cada muestra de las repeticiones de los tratamientos de la transecta Oeste-Este. Sobre las mismas se colocaron 50 microdiscos de papel de filtro como fuente de celulosa, y se incubaron a 30ºC controlando y manteniendo periódicamente, por gravimetría, el nivel de humedad. A los 14, 28 y 35 días se realizó el recuento de los microdiscos degradados, registrándose el porcentaje de degradación. Se registraron cualitativa los distintos tipos de morfologías que se desarrollaron sobre los discos de papel de filtro durante el ensayo. Los datos fueron analizados en el programa INFOSTAT, tabulados y analizados mediante ANOVA realizando una prueba de Tukey ($P<0.05$) para la comprobación de medias. Los valores de porcentaje de degradación total fueron transformados con $\sqrt{}x+1$ para el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Al analizar la actividad celulolítica sobre los microdiscos de papel a través del tiempo, se observaron diferencias temporales y morfológicas entre los diferentes sitios y tratamientos. La degradación fue relativamente más rápida en los suelos de Viale (en todos los tratamientos) y en los suelos de Monte Buey (en AN y BP), con importante degradación a los 14 días y completando el mayor porcentaje a los 28 días de iniciado el proceso. Por el contrario en Bengolea y Pergamino, la degradación se inició más tarde llegando a los 35 días sin haber degradado el total de la fuente de celulosa (Gráfico 1 y Tabla 1).

En cuanto a la velocidad de degradación de los microdiscos de papel sobre las placas de suelo, se observaron diferentes cinéticas, con diferencias globales entre ambientes o sitios de réplicas como así también entre los tratamientos dentro de un mismo ambiente. Las diferencias de cinética entre los tratamientos variaron en forma diferente según el ambiente. De esta manera no encontramos ningún patrón de comportamiento que permita ordenar los sitios o tratamientos de acuerdo con su cinética de degradación de discos de papel.

El intento de aislamiento de microorganismos a partir del suelo sobre medio selectivo con celulosa como fuente de carbono no arroja resultados positivos en una medida comparable a la diversidad microbiológica que se puede observar asociada al fenómeno de degradación de los discos de papel en las placas de suelo. La observación al microscopio electrónico de desarrollos sobre el papel sugiere la presencia de consorcios microbianos asociados a la degradación del mismo. La diversidad en las manifestaciones biológicas/ bioquímicas, colores y aspectos de los desarrollos, difiere según el tratamiento y sitio al que pertenece el suelo y puede registrarse en términos cualitativos, por aspecto de la manifestación, y temporales, por su tiempo y secuencia de aparición y permanencia.

Con este tipo de análisis se encontraron manifestaciones que aparecieron en todos los sitios, como ser las gomosidades, manchas rosadas y anaranjadas. Otras parecen características de sitio (PG). Algunos morfotipos predominaron en un determinado tratamiento como las manchas grises en MP, así como las manchas marrones que sólo aparecieron en los ambientes AN y BP de Monte Buey y Bengolea como también en el ambiente de BP de Viale (Gráfico 2a). La secuencia de morfologías varió por sitio y tratamiento (datos no mostrados aquí). Al analizar el total de clases de morfotipos diferentes desarrollados en los diferentes tratamientos y en los diferentes sitios, se puede observar que en Monte Buey y en Pergamino los lotes de BP presentaron mayor riqueza de morfotipos que los de MP. Esta tendencia no se verificó en los ambientes en Bengolea y en Viale para este muestreo.

En conclusión, con el uso de técnicas tradicionales e integrales fue posible evaluar de manera sistémica la actividad celulolítica de suelos agrícolas bajo siembra directa con diferentes manejos, y caracterizar preliminarmente los morfotipos asociados. En tal sentido se observaron en la mayoría de los ambientes diferencias entre tratamientos en el porcentaje de degradación y la velocidad con la que ocurrió el proceso, Por otro lado se observó una diversidad en la dinámica de las comunidades microbianas asociadas a la degradación de celulosa en los diferentes sitios y tratamientos

Estos resultados sientan las bases experimentales para encarar un análisis en mayor profundidad de los consorcios microbiológicos involucrados en la actividad celulolítica presente en las muestras de suelo. Para ello, en una próxima etapa aplicaremos técnicas moleculares independientes del cultivo para el análisis de los diferentes morfotipos observados.

BIBLIOGRAFÍA:

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT, México, MX, 491 pp.

Crovetto, C. 2002. Cero Labranza; Los rastrojos, la nutrición del suelo y su relación con la fertilidad de las plantas. Ed. Trama Impresores, Talcahuano, Chile, 225 pp.

Kato, S., S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii e Y. Igarashi. 2004. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic Clostridium and aerobic non-cellulolytic bacteria. FEMS Microbiology Ecology 51: 133-142.

Piao, H. C., J. M. Zhu, G. S. Liu, C. Q. Liu y F. X. Tão. 2006. Changes of natural 13C abundance in microbial biomass during litter descomposition. Applied Soil Ecology 33: 3-9.

Winogradsky, S. 1949. Microbiologie du sol, Problemes et methodes. Cinqunante ans recherches. Masson Et Cie Editeurs. Boulevard Saint-Germain, Paris.

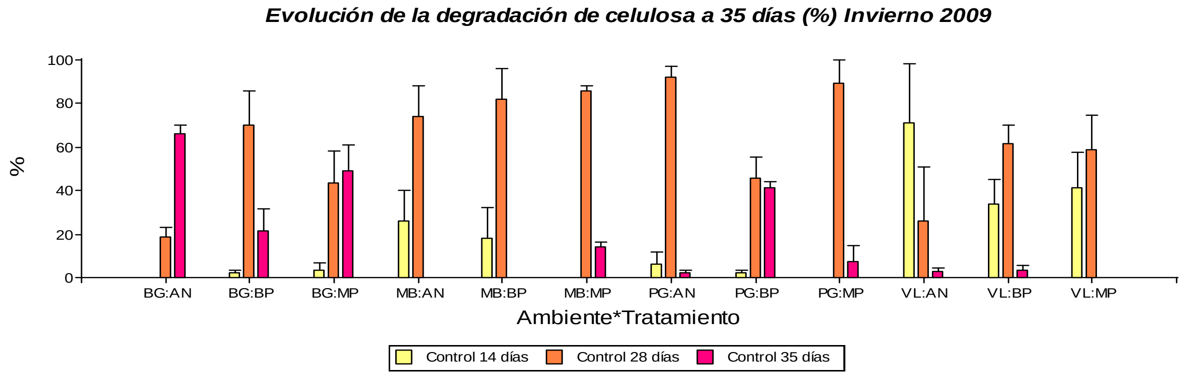
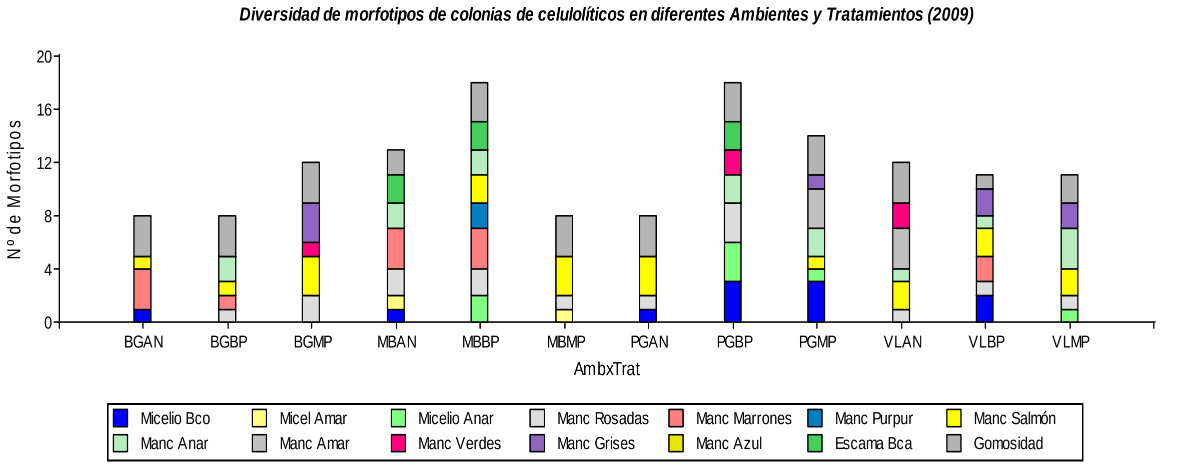


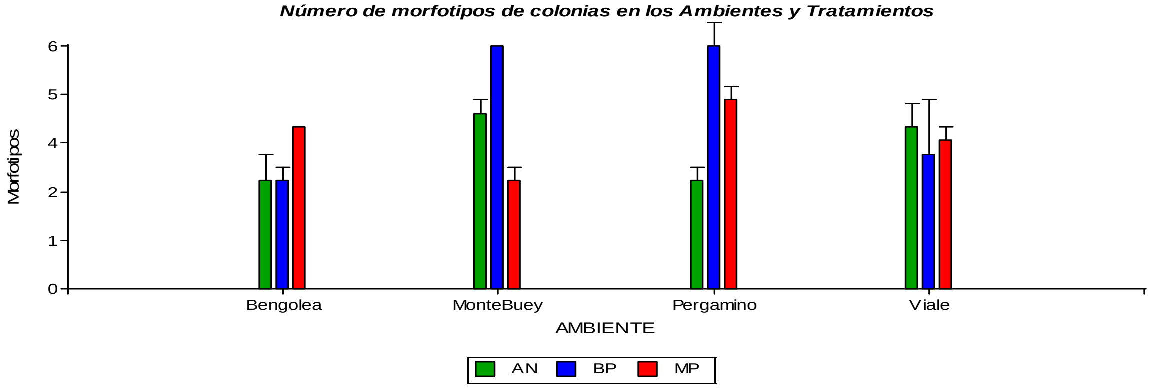
Gráfico 1: Porcentaje de degradación por sitios y ambientes.

	BENGOLEA			MONTE BUEY			PERGAMINO			VIALE			
% Deg. Total	**AN**	**BP**	**MP**	**AN**	**BP**	**MP**	**AN**	**BP**	**MP**	**AN**	**BP**	**MP**	**CV %**
14 días	0 a	2,0 a	3,33 a	26 ab	18 ab	0 a	6 a	2 a	0 a	71,33b	34 ab	41,33ab	**59,02**
28 días	18,67a	72,0 bc	46,67 ab	100 d	100 d	86bcd	98 d	48 abc	89,33cd	97,33d	95,33 d	100 d	**10,16**
35 días	84,67a	93,3 a	96 a	100 a	100 a	100 a	100a	89,33a	96,67 a	100 a	98,67 a	100 a	**3,12**

Tabla 1: Evolución de la degradación de celulosa.



a) Frecuencia de la diversidad de manifestaciones microbianas (morfotipos) desarrollados sobre los microdiscos de papel en las placas de suelo



b) Diversidad microbiana en los diferentes sitios y ambientes de las muestras del invierno de 2009 (manifestaciones microbianas - morfotipos

Gráfico 2: Diversidad de manifestaciones microbianas (morfotipos) desarrollados sobre los microdiscos de papel en las placas de suelo, según los sitios y ambientes.